

DOI: 10.12264/JFSC2024-0190

不同产量水平下凡纳滨对虾小棚模式水质、颗粒相关细菌及周围细菌结构和功能差异

黄勇^{1,3}, 王宝杰¹, 刘梅², 任子文⁴, 蒋克勇¹, 仲晨², 徐科凤², 高焱², 王雷^{1,3}

1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 山东省海洋科学研究院, 海水养殖病害控制重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 山东黄河三角洲海洋科技有限公司, 山东 东营 257000

摘要: 为揭示凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)小棚养殖模式下影响养殖产量的因素, 本研究开展了凡纳滨对虾小棚养殖水质以及颗粒相关细菌(PAB)和非活动自由生活细菌(NFB)结构和功能差异研究, 并基于 16S rRNA 的高通量测序技术分析了不同产量水平下小棚模式两种细菌结构和潜在功能的差异。其结果显示, 高产小棚的悬浮颗粒浓度显著高于低产小棚($P<0.001$), 水体中悬浮颗粒的浓度与对虾产量密切相关; 在小棚养殖水体中, PAB 的 Chao1 和 Shannon 指数均高于 NFB, 表明 PAB 的多样性和丰富度均高于 NFB; 黄杆菌科在颗粒相关细菌中显著富集, 表明黄杆菌科细菌是 PAB 中主要的优势功能微生物; PAB 的生物合成、物质和能量代谢功能通路丰度显著高于 NFB ($P<0.05$), PAB 显著上调的代谢通路为硝化反硝化作用, 表明 PAB 对物质合成和营养盐代谢能力更强; 实时荧光定量 PCR 结果表明, 高产小棚 PAB 中氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌的主要功能基因丰度均高于低产小棚, 表明高产小棚 PAB 中硝化细菌更为成熟。该研究表明, 在对虾小棚模式中, 颗粒相关细菌对养殖水体中含氮污染物的去除发挥了重要作用, 其通过调控水质进一步影响对虾产量。本研究结果可为对虾小棚模式水质调控和高效养殖提供理论依据。

关键词: 小棚模式; 颗粒相关细菌; 菌群结构; 水质调控; 凡纳滨对虾

中图分类号: S954

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)12-1484-13

近些年, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖产业不断扩张, 据联合国粮农组织(FAO)的数据, 2022 年全球凡纳滨对虾的产量已超过 580 万 t^[1]。凡纳滨对虾高产得益于养殖模式的拓展和完善。为提高凡纳滨对虾的产量并确保稳定的供应, 中国出现了池塘养殖、工厂化养殖和小棚养殖等众多养殖模式^[2]。其中, 池塘养殖管理粗放, 易暴发疾病, 效益差。工厂化养殖前期投入成本高, 多采用流水式养殖, 产生的养殖废水较多, 对环境的污染较大^[3]。小棚模式基于微生物去除

污染物的原理, 全程仅少量使用地下水, 产生的养殖废水少, 每个小棚彼此独立且封闭, 具有较高的生物安全性^[4]。因此, 小棚模式以易控制的小水体、受环境影响小、投资回报率高和节约水资源等特点而深受养殖户青睐^[5]。在小棚模式养殖过程中, 养殖产生的残饵和粪便主要由水体中微生物分解。然而, 水体中营养盐降解微生物类群丰度不足、养殖户过度投饵等常常导致水体无机氮营养盐积累, 严重影响养殖物种产量和经济效益。亟须开展相关基础理论研究, 为对虾小棚高

收稿日期: 2024-06-05; 修订日期: 2024-07-06.

基金项目: 山东省重点研发计划基金项目(2023TZX047); 山东省自然科学基金项目(ZR2023MC096).

作者简介: 黄勇(1999-), 男, 硕士研究生, 从事对虾小棚养殖模式研究. E-mail: huangyong200025@163.com.

通信作者: 王雷, 研究员, 从事水产动物营养免疫、环境调控、病害防治及水产品安全学研究. E-mail: wanglei@qdio.ac.cn

效养殖技术提供理论依据。

浮游细菌参与元素和营养物的生物地球化学循环,在水生生态系统中发挥了重要作用^[6]。水生生态系统中的颗粒物主要由浮游生物、死亡生物的遗体和固体颗粒组成^[7-8],为颗粒物相关细菌提供了丰富的生态位。Heins 等^[9]提出颗粒相关细菌(particle-associated bacteria, PAB)由颗粒附着细菌和可运动的趋化细菌组成。活动的自由生活细菌具有趋化效应,能借助鞭毛游向水环境中的颗粒物^[10]。颗粒附着细菌具有附着能力,能够在颗粒物表面定植,可形成生物膜^[11]。它们都能靠近颗粒物形成的营养热点^[11-12]。此外, Zhu 等^[13]和 Azam 等^[14]的研究表明在悬浮颗粒物浓度较高的系统中, PAB 参与了糖类同化作用和无机氮营养盐的硝化作用。这说明在悬浮颗粒浓度较大的水产养殖系统中, PAB 的营养盐代谢功能可能更为强大。然而,到目前为止,对于小棚养殖系统中 PAB 的组成和功能研究有限。对于颗粒附着细菌分离,现有的方法主要通过 3 μm 过滤器来顺序抽滤^[15-16]。然而,这种分离方式并不能分离可运动的趋化细菌。为了富集完整的 PAB 群落(颗粒附着细菌和可运动的趋化细菌),可采用英霍夫锥形管,其允许可运动的趋化细菌跟随沉降的颗粒物游到锥形管底^[17]。这种分离方式使英霍夫锥形管上部水体富含非活动自由生活细菌(non-motile free-living bacteria, NFB),底部富含颗粒和 PAB^[9],为研究 PAB 提供了重要基础。

本研究针对对虾小棚养殖过程中悬浮颗粒浓度不断增加而导致水体浑浊的特点。研究了两种典型产量水平下小棚养殖水体中 PAB 和 NFB 的群落结构和功能差异。同时,测定了悬浮颗粒中与氮转化相关的功能基因丰度。旨在揭示影响对虾小棚养殖产量的关键细菌群落和潜在功能,并阐明高产小棚 PAB 与 NFB 的群落多样性和功能差异。本研究可为小棚模式高产高效和精准化调控水质提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

本实验在中国山东省东营市小棚对虾养殖园

区(37.88°N, 118.55°E)进行。每个小棚长 40 m, 宽 10 m, 养殖期间水深 0.6~0.8 m。实验小棚的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)虾苗(PL10)均购买自山东华春渔业有限公司(东营, 山东), 每个小棚放苗 50000 尾。养殖过程中, 部分小棚由于水体亚硝酸盐浓度过高且持续时间长, 导致对虾的产量较低。低产小棚对虾产量为 450 kg, 成活率为 63%。高产小棚对虾产量为 900 kg, 成活率为 97.2%。两组小棚产量差异显著($P<0.05$)。对这两种产量水平的小棚水质和水体中的细菌分别进行研究。

高产和低产小棚各选取 3 个作为实验小棚。每个小棚的水样采集位置如图 1a 所示。利用英霍夫锥形管(VITLAB, Germany)收集水体中可沉降物和悬浮物, 并测量其体积浓度(SSV)(图 1b)。收集上层水体, 用 0.22 μm 玻璃纤维过滤器(上海新亚净化设备有限公司, 上海, 中国)过滤, 所得滤膜样本作为 NFB 样本。收集英霍夫锥形管底部悬浮颗粒, 使用台式高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司, 上海, 中国) 12000 r/min 离心 1 min, 去除上清液, 所得沉淀作为 PAB 样本^[9]。高产小棚和低产小棚 PAB 和 NFB 均具有 6 个样本, 样本保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 待测。高产小棚的 PAB 和 NFB 样本分别命名为 HP 和 HN, 低产小棚的 PAB 和 NFB 样本分别命名为 LP 和 LN。

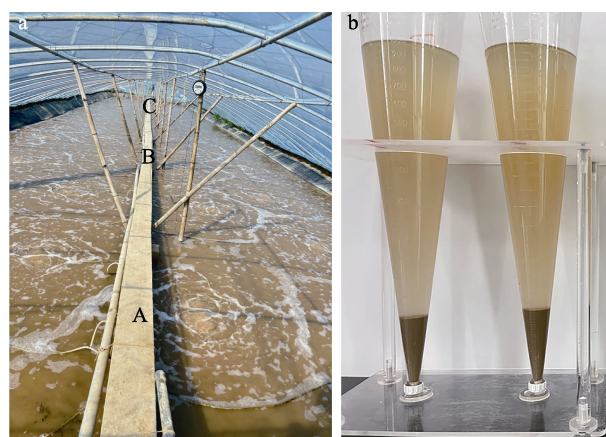


图 1 实验小棚(a)和英霍夫锥形管收集颗粒相关细菌(b)

A、B 和 C 代表每个小棚的取样点

Fig. 1 Experimental small greenhouses (a) and Imhoff tube collection of particle-associated bacteria (b)

A, B and C represent the sampling points for each small greenhouse.

1.2 水质监测

溶解氧(DO)和 pH 均使用哈希便携式水质分析仪(HQ40d)现场测定。总氨氮(TAN)、亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)和可溶性活性磷($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)按照海洋检测规范(GB 17378.4-2007)使用分光光度法测定^[18]。总悬浮固体(TSS)使用称重法进行测定^[19]。总碱度(TA)使用正大总碱度试剂盒(Q/GDCTB O4-2019)测定。

1.3 核酸提取和高通量测序分析

所有样本的总 DNA 按 E.Z.N.A.[®] soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行提取,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度。采用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rRNA V3-V4 区进行 PCR 扩增。然后在上海派森诺生物科技股份有限公司的 Illumina HiSeq 平台(PE250, Illumina, San Diego, CA, USA)对群落 DNA 片段进行双端(paired-end)测序。所有测序数据可在 NCBI sequence read archive database 中以登录号 PRJNA1107122 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1107122/>) 获得。利用 QIIME2 建立 Bray-Curtis 距离度量和 α 多样性指数。利用 principal coordinates analysis (PCoA)来反映样本间群落的差异。使用 linear discriminant analysis effect size (LEfSe)寻找分组之间稳健的差异物种,即生物标志物。PICRUST2 软件用于生成 MetaCyc 代谢途径,来预测每个样品中细菌的功能。具体数据分析在上海派森诺生物科技股份有限公司支持的在线平台进行(<https://www.genescloud.cn>)。

1.4 实时荧光定量 PCR 测定功能基因水平

采用 qPCR 技术检测悬浮颗粒中氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB) *amoA* 基因和亚硝酸盐氧化细菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB) *nxrB* 基因的丰度。一共 3 个样本,每个基因设置 3 个重复。使用 *amoA*-1F/2R (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'/5'-CCCCTCKGSA AAGCCTTCTTC-3')作为 AOB *amoA* 基因的引物,NOB *nxrB* 基因的引物为 *nxrB*-F/R (5'-GAGGAGCGGCATCCGAAGT-3'/5'-GGCABCGR TTCTGGTCG-3')。所有样本 qPCR 反应参照 Chen

等^[20]的研究。

1.5 统计分析

所有的统计分析均使用 IBM SPSS Statistics 26 for Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验各阶段间水质的差异,在方差分析前均进行方差齐性检验。若有显著性差异,则使用 Tukey's homogeneity 检验来确定各阶段间的差异, $P < 0.05$ 为差异显著性阈值。通过 Kruskal-Wallis 秩和检验和 Dunn 事后检验,检验细菌多样性和代谢通路差异的显著性, $P < 0.05$ 为差异显著性阈值。

2 结果与分析

2.1 不同产量对虾小棚水质测定结果

不同产量的小棚养殖后期的水质数据如表 1 所示。高产和低产小棚的 TAN 浓度均低于 1 mg/L,无显著差异($P > 0.05$)。低产小棚的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度为 (18.24 ± 1.51) mg/L,显著高于高产小棚($P < 0.001$)。高产小棚的 pH、TA 和 DO 均显著低于($P < 0.05$)

表 1 不同产量对虾小棚水质指标测定结果

Tab. 1 Measurement results of water quality indexes in shrimp small greenhouses with different yields

$n=3; \bar{x} \pm \text{SD}$

水质 water quality	高产小棚 high-yield small greenhouse	低产小棚 low-yield small greenhouse	<i>P</i>
pH	7.89±0.03 ^b	8.02±0.02 ^a	0.02
TA	313.00±29.00 ^b	443.00±40.00 ^a	0.011
DO (mg/L)	4.88±0.06 ^b	5.43±0.21 ^a	0.012
SSV (mL/L)	11.00±1.00 ^a	2.00±0.30 ^b	<0.001
TSS (g/L)	4.28±0.23 ^a	2.20±0.13 ^b	<0.001
TAN (mg/L)	0.03±0.03 ^a	0.40±0.24 ^a	0.112
$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/L)	0.27±0.07 ^b	18.24±1.51 ^a	<0.001
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	27.27±3.61 ^a	17.79±1.34 ^b	0.012
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (mg/L)	1.43±0.27 ^a	0.82±0.13 ^b	0.023

注: DO, 溶解氧; TAN, 总氨氮; $\text{NO}_2\text{-N}$, 亚硝酸盐; $\text{NO}_3\text{-N}$, 硝酸盐; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, 可溶性活性磷; TA, 总碱度; SSV, 悬浮固体体积; TSS, 总悬浮固体。同列数据上标不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

Note: DO, dissolved oxygen; TAN, total ammonia nitrogen; $\text{NO}_2\text{-N}$, nitrite; $\text{NO}_3\text{-N}$, nitrate; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, soluble reactive phosphorus; TA, total alkalinity; SSV, suspended solids volume; TSS, total suspended solids. Data in the same column labeled with different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

低产小棚。高产小棚的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度均显著高于低产小棚($P<0.01$)。高产小棚的 SSV 和 TSS 分别为(11.0 ± 1.0) mL/L 和(4.28 ± 0.23) g/L, 均显著高于低产小棚($P<0.001$), 这说明高产小棚的悬浮颗粒浓度更高, 水体更浑浊。

2.2 不同产量对虾小棚养殖水体细菌多样性和结构

如图 2a 所示, 大多数样品的 goods-coverage 指数均超过 97%, 表明该测序结果可真实代表实际的细菌群落情况。LP 组的 Chao1 指数最高, 显

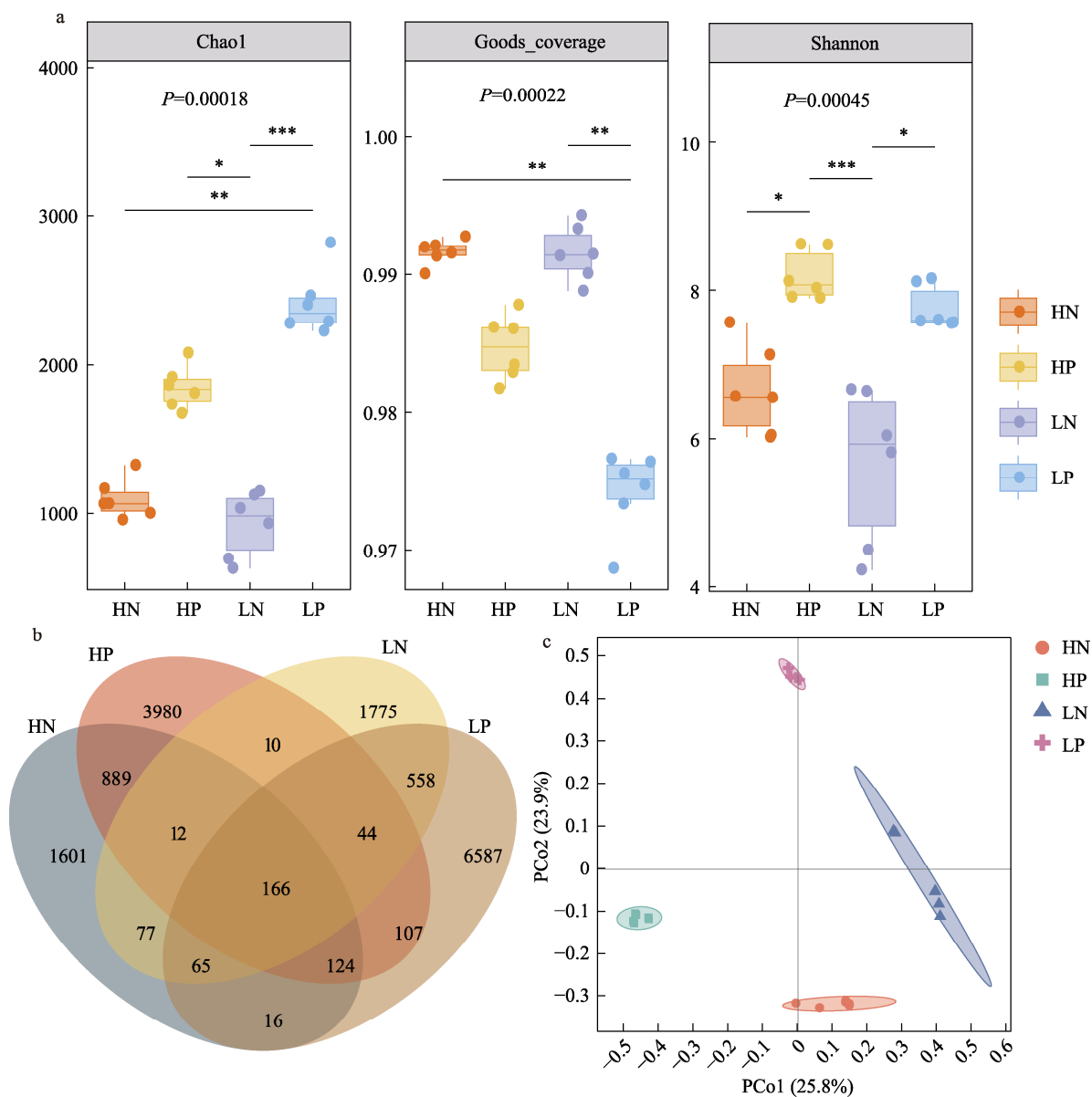


图 2 不同产量小棚养殖水体细菌的多样性和结构

a. α 多样性指数分析; b. Venn 图; c. 基于 Bray-Curtis 的 PCoA 分析. HN: 高产小棚非活动自由生活细菌;

HP: 高产小棚颗粒相关细菌; LN: 低产小棚非活动自由生活细菌; LP: 低产小棚颗粒相关细菌.

*表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$), ***表示组间差异极其显著($P<0.001$).

Fig. 2 Diversity and structure of bacteria in aquaculture waters of small greenhouses with different yields

a. α -diversity index analysis; b. Venn diagram; c. Bray-Curtis-based PCoA analysis. HN: high-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; HP: high-yield small greenhouses particle-associated bacteria; LN: low-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; LP: low-yield small greenhouses particle-associated bacteria. * indicates significant difference ($P<0.05$) between groups; ** indicates highly significant difference ($P<0.01$) between groups, *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$).

著高于 LN 组($P<0.001$)。PAB (HP 组和 LP 组)的 Shannon 指数显著高于 NFB (HN 组和 LN 组)($P<0.05$)。LP 组有 7667 个 ASVs, 是所有分组中最多的(图 2b)。PAB (HP 组和 LP 组)的 ASVs 数量均高于 NFB (HN 组和 LN 组)。上述结果表明 PAB 的多样性和丰富度均高于 NFB。PCoA 的前两个主坐标分别解释了群落组成总变异的 25.8%和 23.9% (图 2c)。所有收集的样品均可分为 4 个聚类, 并且 4 个聚类之间有明显的分离, 各组微生物群落结构均存在明显差异($P<0.05$), 可进行后续分析。

2.3 细菌的群落组成

16S rRNA 测序所得的细菌群落组成如图 3 所示。HN 组和 HP 组的优势菌门相似, 主要为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)和绿弯菌门(Chloroflexi)。LN 组和 LP 组主要优势门为

变形菌门、拟杆菌门和放线菌门(Actinobacteriota), LN 组中放线菌门(26.7%)的相对丰度显著高于其他组($P<0.05$)。PAB (HP 组和 LP 组)中脱硫菌门(Desulfobacterota)和芽单胞菌门(Gemmatimonadota)的相对丰度均显著高于 NFB (HN 组和 LN 组)($P<0.05$)。HP 组中酸杆菌门(Acidobacteriota)的相对丰度显著高于其他组($P<0.05$)。

4 组优势菌科(相对丰度 $>10\%$)如图 3b 所示。HN 组的为红细菌科(Rhodobacteraceae)(43.2%)。HP 组的优势菌科为黄杆菌科(Flavobacteriaceae)(15.9%)和红细菌科(15.8%)。LN 组的优势菌科为红细菌科(40.8%)和 PeM15 (23.8%)。LP 组的优势菌科为红细菌科(17.4%)和黄杆菌科(15.3%)。红细菌科在 4 组中的相对丰度均较高。PAB (HP 组和 LP 组)中黄杆菌科相对丰度显著高于 NFB (HN 组和 LN 组)。

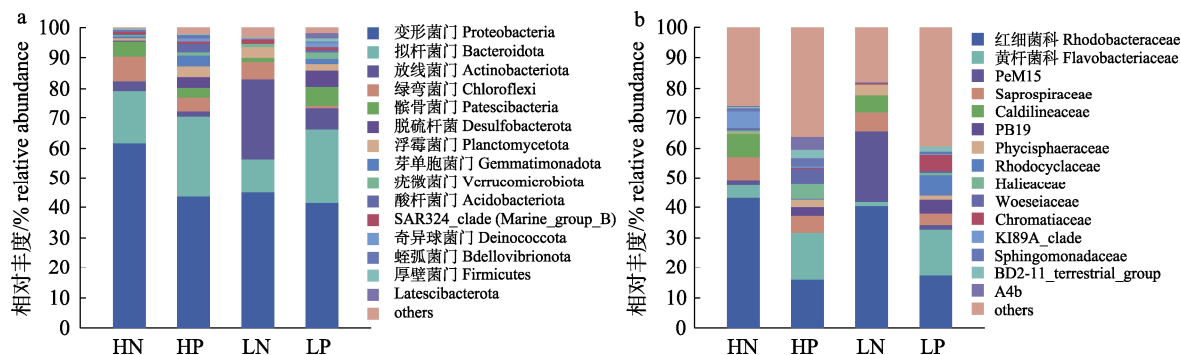


图 3 不同产量小棚养殖水体细菌群落的组成

a. 前 15 门的组成和丰度; b. 前 15 科的组成和丰度. HN: 高产小棚非活动自由生活细菌;

HP: 高产小棚颗粒相关细菌; LN: 低产小棚非活动自由生活细菌; LP: 低产小棚颗粒相关细菌。

Fig. 3 Composition of bacterial communities in aquaculture waters of small greenhouses with different yields

a. Composition and abundance of the first 15 phyla; b. Composition and abundance of the first 15 families.

HN: high-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; HP: high-yield small greenhouses particle-associated bacteria;

LN: low-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; LP: low-yield small greenhouses particle-associated bacteria.

2.4 细菌关键差异物种

为了进一步阐明各组之间细菌分类学水平上差异, 进行 LEfSe 分析(LDA=4.5)。在 4 个聚类中, 4 个属、4 个科、4 个目、3 个纲和 3 个门的细菌类群被鉴定为差异显著的生物标志物(图 4)。HP 组的生物标志物为西南海栖菌属(*Seonamhaecicola*), 属于拟杆菌门。HN 组的生物标志物为海命菌属(*Marivita*), 属于变形菌门中的 α 变形菌纲。来自拟杆菌门的 *Lutibacter* 属被鉴定为 LP 组的生物标志物, 来自放线菌门的 *PeM15* 属被鉴定为 LN 组的生物标志物。HP 组生物标志物西南海栖菌属属于黄杆菌科, 其相对丰度显著高于其他组($P<0.05$)。

HN 组的生物标志物(海命菌属)属于红细菌科, 其相对丰度显著高于其他组($P<0.05$)。

2.5 细菌功能和代谢通路预测

利用 PICRUST2 工具生成 MetaCyc 代谢途径来预测样本细菌的主要功能, 主要包括生物合成、降解/利用/同化、解毒、前体代谢产物和能量的产生、聚糖途径、大分子修饰和代谢簇。PAB (HP 组和 LP 组)前体代谢产物和能量的产生、生物合成和代谢簇功能通路丰度显著高于 NFB (HN 组和 LN 组)($P<0.05$)。LP 组解毒功能通路丰度显著高于 HP 组和 HN 组($P<0.05$)。LP 组降解/利用/同化能通路丰度显著高于 HP 组($P<0.05$)(图 5)。

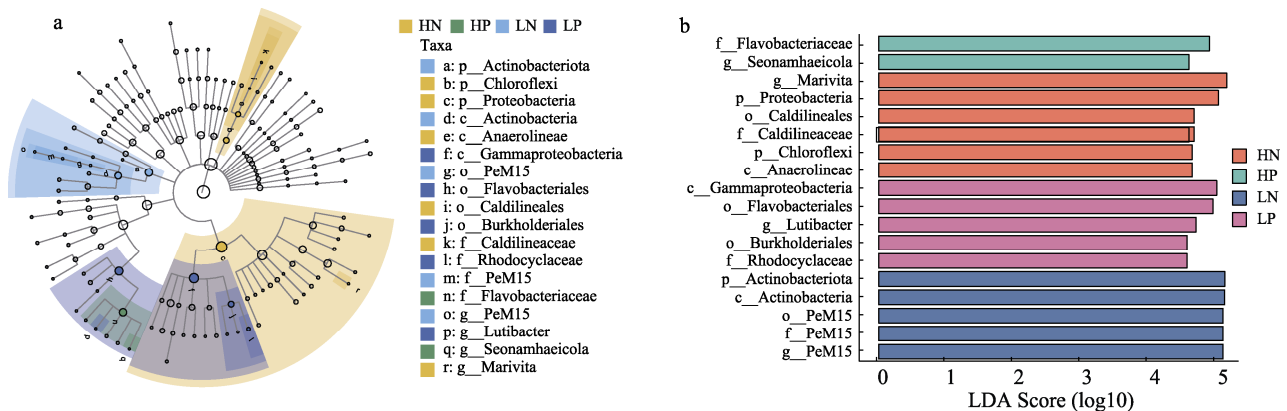


图 4 不同产量小棚养殖水体细菌群落的生物标志物

a. LEfSe 分析分类学分支图; b. LEfSe 分析 LDA 柱状图(LDA=4.5). HN: 高产小棚非活动自由生活细菌; HP: 高产小棚颗粒相关细菌; LN: 低产小棚非活动自由生活细菌; LP: 低产小棚颗粒相关细菌.

Fig. 4 Biomarkers of bacterial communities in aquaculture waters with different yields of small greenhouses a. Taxonomic branching diagram of LEfSe analysis; b. LDA histogram of LEfSe analysis (LDA=4.5).

HN: high-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; HP: high-yield small greenhouses particle-associated bacteria; LN: low-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; LP: low-yield small greenhouses particle-associated bacteria.

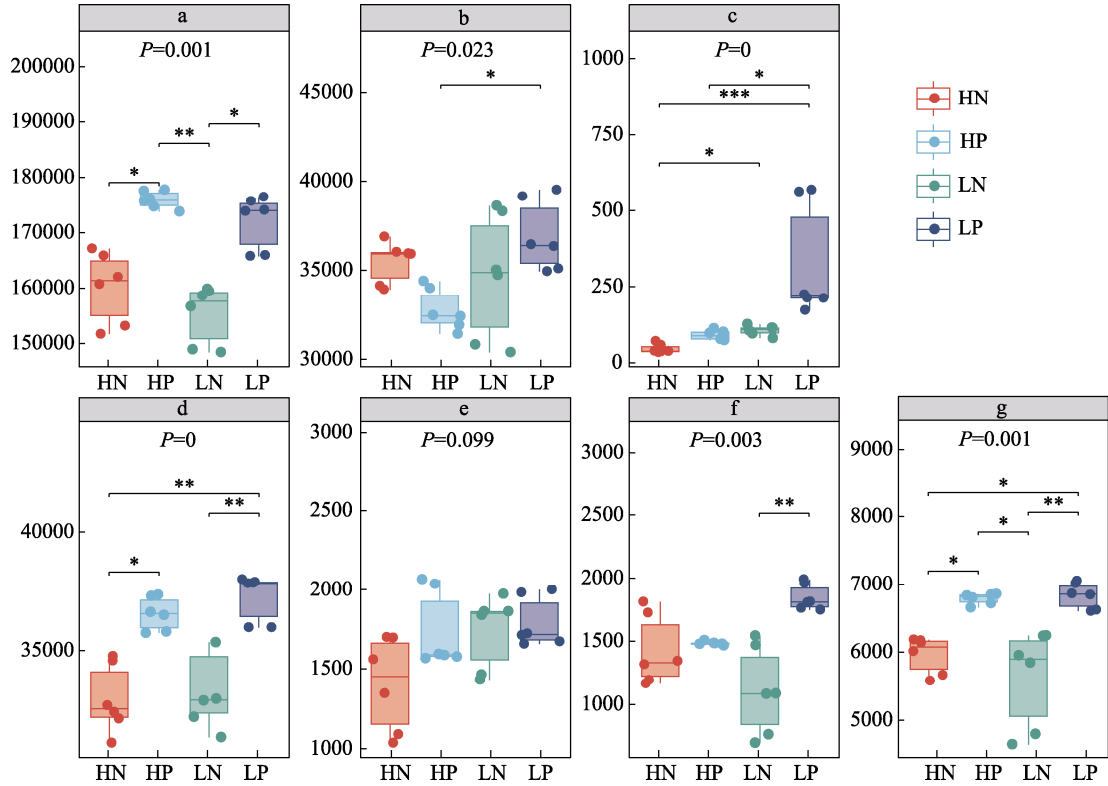


图 5 不同产量小棚养殖水体细菌群落的 MetaCyc 功能预测差异分析

a. 生物合成; b. 降解/利用/同化; c. 解毒; d. 前体代谢产物和能量的产生; e. 聚糖途径; f. 大分子修饰; g. 代谢簇. *表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$), ***表示组间差异极其显著($P<0.001$). HN: 高产小棚非活动自由生活细菌; HP: 高产小棚颗粒相关细菌; LN: 低产小棚非活动自由生活细菌; LP: 低产小棚颗粒相关细菌.

Fig. 5 Differential analysis in predicted MetaCyc functions of bacterial communities in aquaculture waters with different yields of small greenhouses

a. Biosynthesis; b. Degradation/Utilization/Assimilation; c. Detoxification; d. Generation of precursor metabolite and energy; e. Glycan pathways; f. Macromolecule modification; g. Metabolic clusters. * indicates significant difference ($P<0.05$) between groups; ** indicates highly significant difference ($P<0.01$) between groups; *** indicates extremely difference ($P<0.001$); HN: high-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; HP: high-yield small greenhouses particle-associated bacteria; LN: low-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; LP: low-yield small greenhouses particle-associated bacteria.

基于 Bray-Curtis 的功能 PCoA 分析表明, PAB (HP 组和 LP 组)与 NFB (HN 组和 LN 组)的功能组成明显分离, 两者功能差异显著($P<0.05$)(图 6a)。以 HN 组为对照组, 分析 HP 组上调的代谢通路(图 6b)。HP 组显著上调的代谢通路为 PWT-7084 (硝化反硝化)($P<0.001$), 显著下调的代谢通路为

P281-PWY (3-苯丙酸降解)($P<0.001$)。PWT-7084 代谢通路的物种组成中 HP 组的丰度最高(图 6c)。P281-PWY 代谢通路的物种组成中 HN 组的丰度最高(图 6d)。上述结果说明, 在对虾小棚养殖过程中 PAB 在含氮污染物的转化中发挥重要作用, 而 NFB 的主要功能是降解和利用有机物。

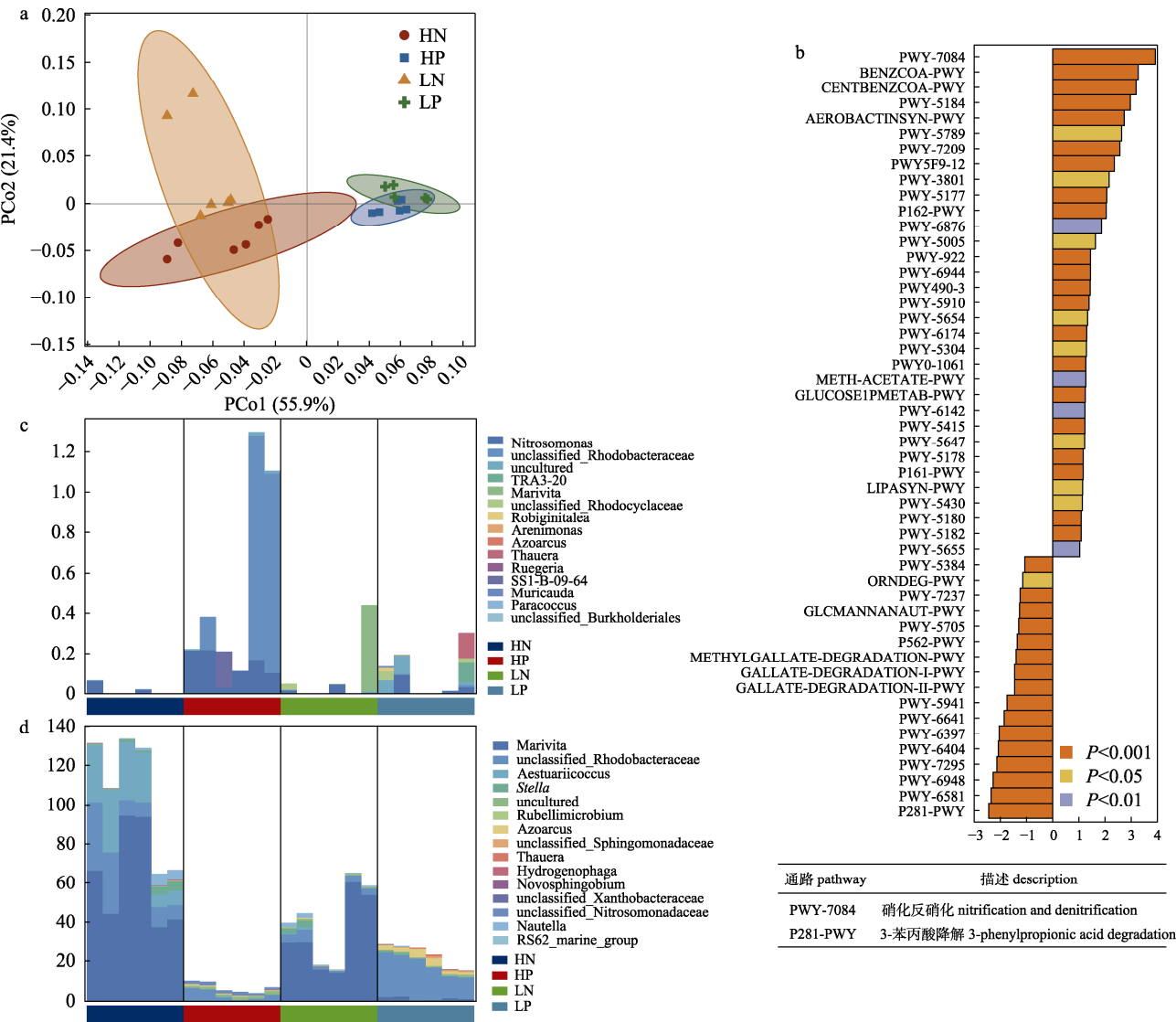


图 6 高产小棚养殖水体中颗粒相关细菌和非活动自由生活细菌的功能代谢通路差异及其物种组成

a. 基于 Bray-Curtis 的功能 PCoA 分析; b. HP 组和 HN 组的代谢通路差异分析; c. PWT-7084 代谢通路(硝化反硝化)的物种组成; d. P281-PWY 代谢通路(3-苯丙酸降解)的物种组成. HN: 高产小棚非活动自由生活细菌; HP: 高产小棚颗粒相关细菌; LN: 低产小棚非活动自由生活细菌; LP: 低产小棚颗粒相关细菌.

Fig. 6 Differences in functional metabolic pathways and species composition of particle-associated and non-motile free-living bacteria in high-yield small greenhouses aquaculture water

a. Bray-Curtis-based functional PCoA analysis; b. Analysis of metabolic pathway differences between HP and HN groups; c. Species composition of the PWT-7084 metabolic pathway (nitrifier denitrification); d. Species composition of the P281-PWY metabolic pathway (3-phenylpropanoate degradation).

HN: high-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; HP: high-yield small greenhouses particle-associated bacteria; LN: low-yield small greenhouses non-motile free-living bacteria; LP: low-yield small greenhouses particle-associated bacteria.

2.6 硝化功能基因丰度

根据 16S rRNA 的测定结果, 悬浮颗粒中氨氧化细菌为亚硝基单胞菌属, 亚硝酸盐氧化细菌主要为硝化螺菌属。进一步利用 qPCR 对 PAB 的 AOB *amoA* 基因和 NOB *nxrB* 基因进行绝对定量(图 7)。HP 组 AOB *amoA* 基因丰度为 3.15×10^7 copies/g, 显著高于 LP 组(3.41×10^5 copies/g)($P < 0.05$)。HP 组 NOB *nxrB* 基因丰度为 8.77×10^8 copies/g, 显著高于 LP 组(1.13×10^5 copies/g)($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 悬浮物与水质和对虾产量的关系

在小棚养殖过程中, 主要通过微生物来调控水质。在本研究中, 高产小棚的 TSS 和 SSV 均显著高于低产小棚($P < 0.001$)。这是由于在悬浮颗粒浓度较大的小棚养殖水体中, PAB 更为丰富, 对营养盐的去除能力更强^[13]。因此, 在本研究中, 观察到高产小棚水体 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度(0.27 mg/L)显著低于低产小棚(18.24 mg/L)。研究表明, 在 25 g/L

盐度水平下, 养殖凡纳滨对虾的安全 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度为 15.2 mg/L^[21]。本研究中低产小棚的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度超出安全水平。亚硝酸盐暴露对水产养殖物种的生长、血液携氧能力和离子稳态等均有不利影响, 并进一步影响养殖物种的产量^[22]。此外, Laverock 等^[23]的研究表明对虾的生物扰动作用可以将表层沉积物与好氧水充分混合。在低产小棚中, 凡纳滨对虾长期处于高浓度的亚硝酸盐水平胁迫下, 其活力和成活率严重降低, 导致水体的悬浮物含量处于较低水平。相反, 在高产小棚中, 池塘表层沉积物可在对虾生物扰动和氧气泵的作用下与好氧水充分混合, 提高水体的悬浮物含量及浑浊度, 给 PAB 提供了更多生态位。因此, 在小棚养殖模式中, 悬浮颗粒的浓度影响水体亚硝酸盐的去除, 水体中亚硝酸盐浓度又影响对虾的活力、产量和成活率, 而对虾的活力、产量和成活率又反作用于水体的悬浮物含量及浑浊度。综上所述, 在小棚模式中, 水体中悬浮颗粒的浓度与水质和对虾产量密切相关。

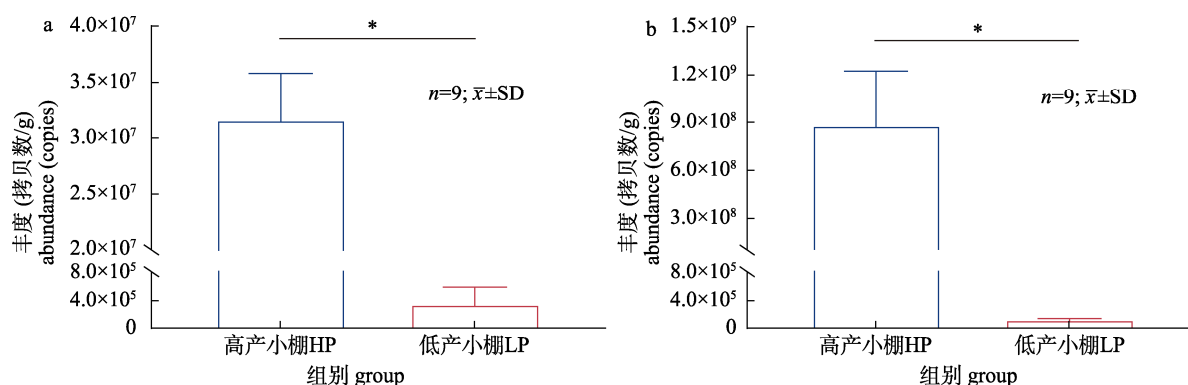


图 7 高产小棚和低产小棚颗粒相关细菌硝化功能基因测定

*代表组间差异显著($P < 0.05$)。a. AOB *amoA* 基因丰度; b. NOB *nxrB* 基因丰度。

Fig. 7 Determination of nitrification function genes of particle-associated bacteria in high and low yielding small greenhouses

* indicates significant difference ($P < 0.05$) between groups.

a. relative abundance of AOB *amoA* gene; b. relative abundance of NOB *nxrB* gene.

3.2 对虾小棚养殖水体中 PAB 和 NFB 的多样性和丰富度

Chao1 指数一般被用来衡量细菌群落的丰富度, Shannon 指数则用于估算细菌群落的多样性^[24]。本研究中两组小棚中 PAB 的 Chao1 指数和 Shannon 指数均高于 NFB。此外, PAB 中检测到的 ASVs 数量均高于 NFB。这都说明 PAB 的多样性和丰富

度都高于 NFB。然而, 已有研究表明自由生活细菌的多样性和丰富度均高于附着细菌^[25-26]。上述研究在地中海及其他海洋生态系统中均报告了自由生活细菌更高的丰富度。Crespo 等^[16]报告了与本研究相同的结果, 其认为丰富度的差异性是由于使用了不同的 DNA 测序技术, 提供了不同数量的序列。此后有学者对水华后水库中自由生活

和颗粒附着细菌研究中也报告附着细菌的丰富度高于自由生活细菌^[27]。本研究中, 由于小棚养殖水体中悬浮泥沙与丰富的有机质等共同形成的悬浮颗粒给细菌提供了良好的附着基和营养条件, 使得 PAB 的丰富度和多样性均高于 NFB。

3.3 对虾小棚养殖水体中 PAB 和 NFB 的组成和差异

细菌的组成和丰度直接影响了水环境中物质和营养元素的循环。本研究中 4 组细菌群落中变形菌门的相对丰度最高。许多研究已经报道变形菌门是池塘和生物滤池等水产养殖系统中最丰富的门, 其主要参与有机物降解和氮循环过程^[20,28-29]。Chen 等^[20]的研究表明拟杆菌门主要参与有机物的降解和发挥絮凝作用。本研究中, PAB 中拟杆菌门的相对丰度比 NFB 中更高。Das 等^[30]提出放线菌门是水产益生菌的重要来源, 可产生包括抗生素在内的多种活性物质, 有益于提高对虾在恶劣环境中的生存能力。在本研究中, LN 组放线菌门的相对丰度显著高于其他组, 这可能与长期处于高浓度亚硝酸盐暴露的环境有关。Yang 等^[31]在根基微生物的研究中发现酸杆菌门相对丰度的增加表明有机质和全氮的降解和利用增加。本研究中 HP 组中酸杆菌门的相对丰度显著高于其他组, 这表明 HP 组有机质和全氮的降解和利用能力高于 LP 组、LN 组和 HN 组。Ohore 等^[32]在河口和海洋生态系统的研究中发现脱硫菌门和芽单胞菌门在碳和硫循环中发挥重要作用。两组小棚 PAB 中脱硫菌门和芽单胞菌门的相对丰度均高于 NFB, 表明碳和硫循环在悬浮颗粒中更高, 这为细菌群落提供了一个安全的微生态位。

Rajeev 等^[33]在生物絮团养殖系统中提出红细菌科的成员为早期海洋生物膜的先驱成员, 同时大多数都具有发达的群体感应系统。此外, 养殖过程中碳源的添加也会促进红细菌科的生长。这解释了红细菌科在 PAB 和 NFB 中均占据主导地位的原因。PAB 中黄杆菌科相对丰度显著高于 NFB。Hu 等^[34]研究表明黄杆菌科的成员能够附着在有机聚集体, 并将非离子氨、亚硝态氮、硫化氢等有毒物质转化为低毒性或无毒性的物质。这说明 PAB 中参与了水体含氮污染物以及有毒物质

的转化, 同时其转化能力高于 NFB。

3.4 对虾小棚养殖水体中不同群落的生物标志物

在本研究中, 4 组细菌群落被清晰的分为 4 个聚类。*Lutibacter* 属被鉴定为 LP 组的生物标志物, *PeM15* 被鉴定为 LN 组的生物标志物。*Lutibacter* 属是常见的与多糖代谢相关的菌株, 能够降解高分子多糖^[35]。*PeM15* 属属于放线菌门, 是主要的益生菌, 能够提高对虾抵抗力^[30]。HP 组的生物标志物为西南海栖菌属, 属于黄杆菌科。西南海栖菌属的成员已被证实具有硝酸盐还原和利用多种碳源的能力, 可能是海洋环境氮循环和碳循环的重要参与者^[36]。本研究中, 海命菌属是 HN 组的生物标志物, 研究表明海命菌属被称为碳水化合物降解属, 能够利用分解有机物, 并通过利用氮素增殖^[5,37], 推测其能够利用碳源并在养殖水体含氮污染物的去除中发挥了重要作用。HP 组和 HN 组中生物标志物的作用与高产小棚中氨氮和亚硝酸盐浓度均处于较低水平的结果相吻合。因此, 西南海栖菌属和海命菌属关键物种对于维持高产小棚中健康稳定的绿色养殖环境具有重要作用。

3.5 对虾小棚养殖水体中细菌功能预测分析

细菌群落的功能对保持水环境的稳定性至关重要。本研究中 PAB 和 NFB 功能差异显著, PAB 生物合成、能量生成和代谢等功能通路丰度显著高于 NFB ($P<0.05$)。这与先前学者对珠江口颗粒相关细菌和自由生活细菌代谢功能差异的研究结果一致^[12]。因此, 可以推测水体中物质和能量合成以及营养物质的代谢等过程更倾向于发生在附着在悬浮颗粒之中。本研究中 LP 组降解/利用/同化和解毒功能通路丰度显著高于 HP 组。这说明低产小棚水环境中有机物和营养物质积累, 导致 PAB 降解/利用/同化的功能显著增强。同时, 有机物的积累也会抑制硝化作用^[38]。此外, LP 组解毒功能通路丰度的上调可能是低产小棚水体中高浓度亚硝酸盐水平的响应。

对 HP 组和 HN 代谢通路差异的分析结果表明 HP 组显著上调的代谢通路为硝化反硝化反应, HN 组显著上调的代谢通路为有机物的降解。这说明在高产小棚成熟的水环境中, PAB 更倾向于发生硝化作用, 去除水体的含氮污染物。同时,

NFB 更偏向于对碳源的利用和有机物的分解。硝化细菌是自养细菌, 倾向于粘附在絮凝物或人工基质上^[39]。在本研究中, 由于对虾的生物扰动作用, 小棚底部的泥沙在氧气泵气流的作用下悬浮在水体中, 增加了硝化细菌的附着面积, 有利于硝化细菌的增殖。研究表明, 硝化速率随着有机物浓度的增加而降低^[38]。水体中 NFB (如海命菌属) 能够利用碳水化合物并降解有机物, 有效防止硝化作用被抑制。

3.6 对虾小棚养殖水体微生物硝化功能基因分析

一般认为硝化作用是由自养硝化细菌驱动的, 包括 AOB 和 NOB。氨首先在 AOB 的作用下转化为亚硝酸盐, NOB 可将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[40]。尽管硝化细菌在含氮污染物的去除中发挥主要的作用, 但是仍然不是优势菌群, 硝化菌群占总菌群的比例较低, 也因此通过 16S rRNA 高通量测序技术分析微生物群落组成很难说明硝化菌群的差异情况^[41]。本研究利用实时荧光定量技术, 发现了 HP 组 AOB *amoA* 基因和 NOB *nxrB* 基因丰度均显著高于 LP 组。低丰度的 NOB 菌群说明水体中的硝化反应不完全, 导致低产小棚水体中亚硝酸盐的积累。长时间、高浓度的亚硝酸盐水平暴露使得低产小棚对虾的产量和成活率都较低。在生物絮团系统中, 也报道了高浓度的亚硝酸盐导致饲料利用率和存活率较低的情况^[42]。高产小棚悬浮颗粒中 AOB 和 NOB 菌群丰度均较高, 说明其在含氮污染物的转化中发挥了重要作用。在本研究中成熟的高产小棚养殖系统中 ($\text{TAN} < 1 \text{ mg/L}$, $\text{NO}_2\text{-N} < 1 \text{ mg/L}$), 硝酸盐的浓度并未明显积累 (27.27 mg/L)。Ray 等^[43]比较了化能自养系统和 3 种异养系统, 发现在自养系统中硝酸盐达到 162 mg/L 的峰值积累。这说明高产小棚养殖系统中具有成熟的自养系统, 可能还存在反硝化作用, 有效避免了硝酸盐的过度积累。对于小棚模式成熟系统中悬浮颗粒上完整氮循环的研究, 今后还需要利用宏基因组等技术来进一步研究。

4 结论

综上所述, 在小棚养殖水体中, 颗粒相关细菌的多样性和丰富度均高于非活动自由生活细

菌。黄杆菌科主要在颗粒相关细菌中显著富集。颗粒相关细菌的生物合成、物质和能量代谢功能通路丰度显著高于非活动自由生活细菌。相比于非活动自由生活细菌, 颗粒相关细菌显著上调的代谢通路为硝化反硝化。高产小棚悬浮颗粒中 AOB 和 NOB 菌群的丰度显著高于低产小棚。该研究表明, 在对虾小棚模式中, 颗粒相关细菌对养殖水体中含氮污染物的去除发挥了重要作用, 其通过调控水质而进一步影响对虾产量。本研究从微生物菌群组成、功能预测以及关键功能基因定量分析等角度解析了影响小棚模式养殖产量的关键因素, 对小棚模式养殖实践具有重要理论指导意义。

参考文献:

- [1] Tacon A G J. Contribution of fish and seafood to global food and feed supply: An analysis of the FAO food balance sheet for 2019[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2023, 31(2): 274-283.
- [2] Chang Z Q, Neori A, He Y Y, et al. Development and current state of seawater shrimp farming, with an emphasis on integrated multi-trophic pond aquaculture farms, in China—a review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2544-2558.
- [3] Dong J. Discussion on green culture mode of *Penaeus vannamei* in small shed in Dongying City[J]. *Hebei Fisheries*, 2022(4): 14-17. [董俊. 东营市小棚养虾的绿色养殖模式探讨[J]. *河北渔业*, 2022(4): 14-17.]
- [4] Wan X H. Analysis on the development status of *Penaeus vannamei* “Rudong shed” model[J]. *Scientific Fish Farming*, 2017(4): 1-3. [万夕和. 南美白对虾“如东小棚”模式的发展现状分析[J]. *科学养鱼*, 2017(4): 1-3.]
- [5] Fang Y, Li H, Wang L B, et al. Study on bacterial community structure in rearing water in small greenhouse of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2023, 19(3): 29-41. [方圆, 黎慧, 王李宝, 等. 凡纳滨对虾小型温棚养殖模式水体微生物群落的研究[J]. *南方水产科学*, 2023, 19(3): 29-41.]
- [6] Wu H N, Li Y, Zhang W L, et al. Bacterial community composition and function shift with the aggravation of water quality in a heavily polluted river[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 237: 433-441.
- [7] Mestre M, Borrull E, Sala M, et al. Patterns of bacterial diversity in the marine planktonic particulate matter continuum[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(4): 999-1010.
- [8] Farnelid H, Turk-Kubo K, Ploug H, et al. Diverse diazotrophs

- are present on sinking particles in the North Pacific Subtropical Gyre[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 170-182.
- [9] Heins A, Harder J. Particle-associated bacteria in seawater dominate the colony-forming microbiome on ZoBell marine agar[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, 99(1): 151.
- [10] Stocker R, Seymour J R. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(4): 792-812.
- [11] Yan X, Li S Z, Abdullah Al M, et al. Community stability of free-living and particle-attached bacteria in a subtropical reservoir with salinity fluctuations over 3 years[J]. *Water Research*, 2024, 254: 121344.
- [12] Liu Y Y, Lin Q, Feng J R, et al. Differences in metabolic potential between particle-associated and free-living bacteria along Pearl River Estuary[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 728: 138856.
- [13] Zhu W J, Wang C, Hill J, et al. A missing link in the estuarine nitrogen cycle? : Coupled nitrification-denitrification mediated by suspended particulate matter[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2282.
- [14] Azam F, Hodson R E. Size distribution and activity of marine microheterotrophs[J]. *Limnology and Oceanography*, 1977, 22(3): 492-501.
- [15] Xie X Q, Yuan K, Chen X, et al. Characterization of metal resistance genes carried by waterborne free-living and particle-attached bacteria in the Pearl River Estuary[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 327: 121547.
- [16] Crespo B G, Pommier T, Fernández-Gómez B, et al. Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA[J]. *MicrobiologyOpen*, 2013, 2(4): 541-552.
- [17] Heins A, Reintjes G, Amann R I, et al. Particle collection in imhoff sedimentation cones enriches both motile chemotactic and particle-attached bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 643730.
- [18] Chen C T, Wang F, Ren Z W, et al. Influencing factors on nitrite removal by bagasse bioflocs and the succession of attached microbial communities[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2024, 59: 105057.
- [19] Huang H H, Luo T, Lei Y J, et al. Water quality, shrimp growth performance and bacterial community in a reusing-water biofloc system for nursery of *Penaeus vananmei* rearing under a low salinity condition[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100894.
- [20] Chen S J, Sun X Q, Tian X L, et al. Influence of ammonia nitrogen management strategies on microbial communities in biofloc-based aquaculture systems[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 903: 166159.
- [21] Lin Y C, Chen J C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels[J]. *Aquaculture*, 2003, 224(1-4): 193-201.
- [22] Ciji A, Akhtar M S. Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 878-908.
- [23] Laverock B, Gilbert J A, Tait K, et al. Bioturbation: Impact on the marine nitrogen cycle[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(1): 315-320.
- [24] Kim B R, Shin J, Guevarra R, et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(12): 2089-2093.
- [25] Li J T, Wei B B, Wang J N, et al. Variation in abundance and community structure of particle-attached and free-living bacteria in the South China Sea[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2015, 122: 64-73.
- [26] Eloë E A, Shulse C N, Fadrosch D W, et al. Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(4): 449-458.
- [27] Liu M, Liu L M, Chen H H, et al. Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria following a reservoir *Microcystis* bloom[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660: 501-511.
- [28] Liu Q, Lei X J, Li J N, et al. Microbial communities and nitrogen cycling in *Litopenaeus vannamei* and *Mercenaria mercenaria* polyculture ponds[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 33: 101769.
- [29] Kim S K, Song J, Rajeev M, et al. Exploring bacterioplankton communities and their temporal dynamics in the rearing water of a biofloc-based shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 995699.
- [30] Das S, Ward L R, Burke C. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 419-429.
- [31] Yang Y H, Xu N H, Zhang Z Y, et al. Deciphering microbial community and nitrogen fixation in the legume rhizosphere [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(11): 5659-5670.
- [32] Ohore O E, Wei Y J, Wang J H, et al. Vertical characterisation of phylogenetic divergence of microbial community structures, interaction, and sustainability in estuary and marine ecosystems[J]. *Science of the Total*

- Environment, 2022, 851: 158369.
- [33] Rajeev M, Jung I, Song J, et al. Comparative microbiota characterization unveiled a contrasting pattern of floc-associated versus free-living bacterial communities in biofloc aquaculture[J]. Aquaculture, 2023, 577: 739946.
- [34] Hu D, Wang L P, Zhao R, et al. Core microbiome involved in nitrite removal in shrimp culture ponds[J]. Aquaculture Research, 2022, 53(5): 1663-1675.
- [35] Lee S Y, Lee M H, Oh T K, et al. *Lutibacter aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment, and emended description of the genus *Lutibacter* Choi and Cho 2006[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 2): 420-424.
- [36] Zhang X Y, Zhang R, Zhong Y L, et al. *Seonamhaecola sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(6): 1295-1300.
- [37] Shu D T, He Y L, Yue H, et al. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by 454 high-throughput pyrosequencing[J]. Bioresource Technology, 2015, 186: 163-172.
- [38] Yang E Z, Chen J, Liu K, et al. Intensifying single-stage denitrogen by a dissolved oxygen-differentiated airlift internal circulation reactor under organic matter stress: Nitrogen removal pathways and microbial interactions[J]. Water Research, 2023, 241: 120120.
- [39] Sun H H, Narihiro T, Ma X Y, et al. Diverse aromatic-degrading bacteria present in a highly enriched autotrophic nitrifying sludge[J]. Science of the Total Environment, 2019, 666: 245-251.
- [40] Sun J L, Rengel Z, Zhou Y Z, et al. Ammonia-oxidizing Archaea bacteria (AOB) and comammox drive the nitrification in alkaline soil under long-term biochar and N fertilizer applications[J]. Applied Soil Ecology, 2024, 193: 105124.
- [41] Yao Q, Peng D C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 25.
- [42] Ray A J, Lotz J M. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(8): 4390-4398.
- [43] Ray A J, Lotz J M. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources[J]. Aquacultural Engineering, 2014, 63: 54-61.

Differences in water quality, bacterial structure and function of particle-associated bacteria and surrounding bacteria in small greenhouse farms of *Litopenaeus vannamei* under different yield levels

HUANG Yong^{1,3}, WANG Baojie¹, LIU Mei², REN Ziwen⁴, JIANG Keyong¹, ZHONG Chen², XU Kefeng², GAO Yan², WANG Lei^{1,3}

1. CAS and Shandong Province Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Key Laboratory for Disease Control in Mariculture, Marine Science research Institute of Shandong Province, Qingdao 266071, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
4. Shandong Yellow River Delta Marine Technology Co., Ltd., Dongying 257000, China

Abstract: In recent years, the number of small greenhouse farms in China has expanded rapidly. Within the aquaculture process of these small greenhouses, microorganisms play a key role in decomposing residual bait and feces in the water column. However, the lack of nutrient-degrading microbial taxa in the water column, combined with excessive baiting by farmers, often leads to the accumulation of inorganic nitrogen. This accumulation negatively affects the yield and economic benefits of cultured species. The present study was conducted to investigate the differences in water quality, as well as the structure and function of particle-associated bacteria (PAB) and non-mobile free-living bacteria (NFB) in small greenhouse farms. This investigation focuses on the turbidity of the water column caused by the increasing concentration of suspended particles during the aquaculture process, in order to reveal the factors influencing the culture yield. Differences in the structure and potential function of the two bacteria were analyzed by high-throughput sequencing of 16S rRNA. Additionally, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the abundances of ammonia-oxidizing bacteria *amoA* and nitrite-oxidizing bacteria *nirB*, both of which are associated with nitrogen transformation in suspended particles. The results of this study showed that the concentration of suspended particles was significantly higher in high-yield small greenhouses compared to low-yield small greenhouses ($P < 0.001$). Additionally, the concentration of suspended particles in the water column was closely related to shrimp production. The Chao1 and Shannon indices of PAB were found to be higher than those of NFB in the aquaculture water column of small greenhouses, indicating greater diversity and abundance of PAB. Notably, Flavobacteriaceae were significantly enriched in PAB, indicating that they were the dominant functional microorganisms in PAB. The abundance of biosynthesis, material, and energy metabolism functional pathways in PAB was significantly higher than that in NFB ($P < 0.05$). Among these ways, nitrification-denitrification was notably upregulated in PAB, indicating that PAB is more capable of material synthesis and nutrient metabolism. Real-time fluorescence quantitative PCR results revealed that the abundances of major functional genes of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria were higher in the PAB of high-yield small greenhouses than in those of low-yield small greenhouses, indicating that nitrifying bacteria were more mature in the PAB of high-yield small greenhouses. This study demonstrated that PAB play an essential role in the removal of nitrogenous pollutants from aquaculture water in small greenhouse farms, which further affects shrimp production by regulating water quality. The results of this study provide an important theoretical basis for water quality control and efficient shrimp culture in small greenhouse farms.

Key words: small greenhouse farms; particle-associated bacteria; bacterial community structure; water quality regulation; *Litopenaeus vannamei*

Corresponding author: WANG Lei. E-mail: wanglei@qdio.ac.cn